ISSN 0554-2111 (Impreso) ISSN 2244-8888 (En línea)

Pittieria
40
2016 ENERO-DICIEMBRE
pp. 144—163

ASOCIACIÓN ENTRE MICROSATÉLITES Y LA RESISTENCIA A *Phytopthora megasperma*, EN ÁRBOLES DE *Theobroma cacao* L. I. ANÁLISIS DEL FENOTIPO Y DEL GENOTIPO

ASSOCIATION BETWEEN MICROSATELLITES WITH THE RESISTANCE TO *Phytophthora megasperma* IN *Theobroma cacao* L. TREES. I. PHENOTYPE AND GENOTYPE ANALYSIS

por

VÍCTOR MORA[1], MARÍA MARCANO[1], RAISA RUMBOS[2], IRAIMA CHACÓN[3], ÁLVARO GÓMEZ[4], MARÍA ROSALES[1] Y ARGENIS MORA[5]

[1] Laboratorio de Genética y Química Celular, Facultad de Ciencias, Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela. **marseg@ula.ve**

[2] Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA), Estación Local Chama, Estado Zulia.

[3] CORPOZULIA, Centro Socialista de Investigación y Desarrollo (CESID)–Cacao, Estado Zulia

[4] Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA), Mérida, Estado Mérida.

[5] Instituto de Investigaciones para el Desarrollo Forestal (INDEFOR), Facultad de Ciencias Forestales y Ambientales, Universidad de Los Andes.

RECIBIDO: noviembre 02 de 2015 / **ACEPTADO:** abril 01 de 2016

RESUMEN

El cacao venezolano, reconocido a nivel mundial por sus excelentes cualidades aromáticas procedentes del cacao tipo Criollo, es considerado también el más sensible a plagas y enfermedades. Una de las enfermedades que afectan a las plantaciones de cacao en la zona Sur del Lago de Maracaibo, es la "Mancha de agua", causada por *Phytophthora megasperma* Dreschler, que ocasiona sobre los frutos una mancha de color marrón claro, de bordes regulares concéntricos que puede llegar a cubrir toda la mazorca, y afectar a las semillas. En este trabajo, 68 árboles de cacao de las Colecciones vivas del INIA y de CORPOZULIA, fueron caracterizados mediante 23 marcadores microsatélite y evaluados en su respuesta ante *P. megasperma*. De estos árboles, fueron desprendidas mazorcas en madurez fisiológica, inoculadas mediante aspersión de gotas finas, con $1x10^5$ zoosporas/ml y mantenidas por cuatro días a 26ºC, en cámara húmeda y oscuridad. Se evaluó el nivel de resistencia de cada individuo, según una escala cualitativa, en un rango del 1 (altamente resistente) al 8 (altamente susceptible), considerando presencia, tamaño y características de las lesiones observadas. La prueba para datos No Paramétricos de Kruskal y Wallis reveló variabilidad en los niveles de resistencia a *P. megasperma*, confirmando su naturaleza poligénica, en las plantas evaluadas. El análisis del ADN reveló genotipos, desde Criollos homocigotas, hasta Forasteros homocigotas. La respuesta de resistencia fue variable en cultivares heterocigotas, mostrando 10 árboles alta resistencia e igualmente fue variable en Criollos homocigotas, mostrando dos de ellos alta resistencia al patógeno.
PALABRAS CLAVE: cacao Criollo, *Phytophthora megasperma*, resistencia, microsatélites.

ABSTRACT

The Venezuelan cocoa recognized worldwide for its excellent aromatic qualities, is derived from the Criollo cultivars, which also happen to be highly susceptible to pests and diseases. Among the diseases that affect the Criollo cocoa plantations of the South of the Maracaibo Lake, is the "Mancha de Agua" caused by *Phytophthora megasperma* Dreschler. This pathogen develops on the fruits light brown concentric lesions with defined borders, which it may penetrate in the inner tissues damaging the cocoa seeds. The present research involved 68 trees, belonging to the Collections of INIA and CORPOZULIA; these were characterized using 23 microsatellite markers and tested for resistance to *P. megasperma*. Physiologically mature pods from the selected trees were detached and inoculated by spraying fine drops containing $1x10^5$zoospores/ml and kept four days at 26ºC, in a humid chamber in complete darkness. The level of resistance was evaluated in each individual according to a qualitative scale, which ranged from 1 (highly resistant) to 8 (highly susceptible), considering presence, size and characteristics of the lesions. All of the results were analyzed by the Kruskal-Wallis test for Non Parametric data. Our results revealed an important variability, confirming the polygenic nature of the resistance to *P.megasperma* in evaluated plants. The DNA analysis revealed a broad range of diversity; ranging from homozygous Criollo, to homozygous Forastero genotypes. Resistance levels were highly variable in the heterocigote cultivars, of which 10 cultivars resulted highly resistant; whereas in the Criollo homozygous trees, only two of them proved to be resistant.
KEY WORDS: criollo cacao, *Phytophthora megasperma*, resistance, microsatellites.

INTRODUCCIÓN

El cacao es una planta de gran importancia a nivel mundial, siendo entre sus principales productores Costa de Marfil (34 %), Ghana (18 %), Indonesia (15 %) Nigeria, Camerún, Ecuador y Brasil; Venezuela, a pesar de ser un país productor de cacao fino de aroma, aporta junto con otros países sólo el 1 % en la producción mundial de cacao (ICCO, 2012).

Los cacaos cultivados se pueden clasificar en cuatro grandes grupos morfogeográficos: Criollos, Trinitarios ó Deltanos, Forasteros del Bajo Amazonas y Forasteros del Alto Amazonas (Lanaud *et al*., 1999).

La denominación de cacao "Criollo" se extiende no solo a los tipos de almendras blancas o de colores claros y grandes o gruesas, sino a los cultivados en regiones cacaoteras de nuestro país, que alcanzaron fama debido a la calidad aromática de su cacao "Criollo" (Marcano, 2007). Los cacaos Criollos homocigotos, han sido denominados Criollos "Antiguos", como indicativo de que fueron éstos los cacaos cultivados por los antiguos pobladores de América, para distinguirlos de los cacaos Criollos híbridos, llamados Criollos "Modernos" (Motamayor *et al*., 2002). En general, el cacao Criollo es el que posee mejores cualidades aromáticas y de sabores reconocidos a nivel mundial; sin embargo, ha sido considerado sensible a un gran número de plagas y enfermedades, en comparación con otros grupos de cacao (Reyes & Reyes, 2000).

En nuestro país se ha encontrado una diversidad de tipos Criollos, entre los cuales se incluyen los "Porcelana", los "Pentágona", los Guasare y varios tipos de "Andinos". Sin duda los cacaos Criollos Modernos son los más representativos de las plantaciones venezolanas, constituyendo casi el 90 % de la producción del país. Son estos híbridos formados principalmente a partir del cruce entre un Criollo ancestral y un Forastero del Bajo Amazonas (Motamayor *et al*., 2003), y posteriores retrocruzas, ya sea hacia Criollos antiguos, lo que ha ocurrido con mayor frecuencia en el occidente del país, mientras que retrocruzas hacia Forasteros amazónicos, han sido más comunes en el oriente venezolano. Las introgresiones de Forastero son importantes porque estos cacaos pudieran portar resistencia a enfermedades, mayor vigor y rendimiento (Marcano, 2007).

Los cacaos Forasteros bajo Amazónicos constituyen casi la totalidad de los cacaos corrientes plantados en Brasil y en África Occidental, Malasia e Indonesia. Su producción cubre casi el 80 % de la producción mundial de cacao (Reyes & Reyes, 2000).

Gracias a las actividades nacionales de rescate, caracterización y conservación de árboles de cacao de tipo Criollo, hoy nuestro país cuenta con varias colecciones vivas que preservan esta diversidad, ya analizada en caracteres agronómicos, morfológicos y moleculares. El comportamiento de estas colecciones ante enfermedades recién se ha comenzado a evaluar (Pino, 2009), siendo esta una información necesaria para identificar plantas resistentes y más productivas, con el fin de integrarlas a programas de propagación vegetativa o a estrategias de mejoramiento genético.

Las plantaciones de cacao, tanto en Venezuela como en el resto del mundo, se ven seriamente afectadas por una gran variedad

de plagas y enfermedades que merman su producción y disminuyen la calidad de su producto.

Entre las especies de *Phytophthora* que causan enfermedades en plantas de cacao se encuentran *P. palmivora, P. megakarya, P. capsici, P. citrophthora, P. megasperma, P. nicotianae y P. arecae*. De estas especies, *P. palmivora*, es el patógeno más frecuente en todas las zonas cacaoteras del mundo, causando la enfermedad de podredumbre negra en las mazorcas y cáncer de ramas y de tronco (Iwaro *et al*., 1997), ocasionando pérdidas anuales que superan el 20-30 % de la producción mundial de cacao, cuando las condiciones climáticas son favorables para el patógeno (Iwaro *et al*., 1997; Flament *et al*. 2001 y Lopes *et al*., 2006), así mismo se estima que el 90 % de los cultivares son variedades susceptibles a estas enfermedades (Iwaro *et al*., 1997).

La enfermedad conocida como “Mancha de Agua” en frutos de cacao, es causada por el patógeno *Phytophthora megasperma* Dreschler, descrita por primera vez en el Sur del Lago de Maracaibo en los años 70 (Capriles, 1978). En esta región, la enfermedad ha ocasionado considerables pérdidas al cultivo. Tomando en cuenta que el cacao es un cultivo perenne y que las condiciones ambientales del área son favorables para el patógeno, éste se encuentra ampliamente distribuido en la zona (Delgado, 1985). En el 2007 se presentó el primer reporte de la Mancha de Agua en frutos de cacao, causada por (*Phytophthora megasperma* Dreschler) en el sector Bohordal, Río Caribe, Edo. Sucre (Rumbos *et al*., 2007).

El síntoma típico de la enfermedad “Mancha de agua” es una mancha de bordes irregulares, en cuya zona central se presenta una verruga que se torna de coloración más intensa y que varía de marrón oscuro a totalmente necrosada. Bajo condiciones de alta humedad relativa (80-100 %), las manchas se cubren con un micelio algodonoso blanquecino, en forma concéntrica. El síntoma interno consiste en decoloraciones claras y oscuras en forma de anillos concéntricos en el mesocarpio, que avanza hacia el endocarpio afectando las almendras hasta ocasionar la pudrición total del fruto. La mancha progresa internamente y las almendras, aunque estén afectadas, son fáciles de extraer; hasta ahora no se ha encontrado daño en hojas o tallos causado por *P. megasperma* (Rumbos *et al*., 2007).

Los avances en el estudio de la resistencia genética en el cacao a las enfermedades producidas por especies del género *Phytophthora* con fines de mejoramiento genético, logrados mediante ensayos de inoculación del patógeno en mazorcas y en discos de hoja, han determinado que se trata de un carácter de herencia multigénica y aún no se ha encontrado una resistencia total a estas enfermedades (Risterucci *et al*., 2003).

La inoculación de mazorcas desprendidas brinda la oportunidad de evaluar rápidamente la resistencia a las infecciones de *Phytophthora*. Esta proporciona información sobre la resistencia a la penetración y la post penetración, basada en la frecuencia y el tamaño de las manchas generadas. El método es particularmente útil para la evaluación de colecciones de germoplasma donde la inoculación de mazorcas adheridas

al árbol es restringida (Phillips y Galindo, 1989; Blaha *et al*., 2000; Iwaro *et al*., 2006), así mismo para evaluar la resistencia de las plantas al patógeno cuya única zona de incidencia es el fruto, como ocurre con *P. megasperma* (Rumbos *et al*., 2007). Numerosas investigaciones han validado las bondades de esta prueba (Iwaro *et al*., 2005; Iwaro *et al*., 2006).

La caracterización molecular de los seres vivos es una herramienta de gran utilidad para identificar a los individuos, estudiar las relaciones entre los mismos, conocer la diversidad de una especie y su estructura, además de posibilitar la ubicación de genes de importancia en el mapa de ligamiento genético y en el mapa físico de la especie. Existe una gran diversidad de marcadores moleculares utilizados, siendo algunos preferidos, de acuerdo al objetivo de la investigación y al grado de desarrollo de marcadores para una especie o género en particular. En el caso del cacao, una colección de pares de "primers" para más de 400 marcadores microsatélites aislados a partir de genotecas de ADN de cacao, enriquecidas en secuencias repetitivas, ha sido desarrollada por el CIRAD (*Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement*, Montpellier, Francia); sus secuencias y especificaciones están disponibles en la base de datos europea de Biología Molecular EMBL. Muchos de estos microsatélites han sido localizados en el mapa genético de referencia del cacao, por lo que constituyen excelentes herramientas para diversos tipos de investigaciones (Pugh, *et al*., 2004).

Los microsatélites ó SSRs (Single Sequence Repeats) son secuencias cortas repetidas generalmente de 2-6 pares de bases que se encuentran distribuidas al azar a lo largo del genoma en todos los organismos superiores. Algunas de las características por las cuales estos marcadores han sido considerados una poderosa herramienta para estudios genéticos son: elevado grado de polimorfismo, herencia mendeliana simple, codominancia, pudiéndose diferenciar los individuos homocigotos de los heterocigotos; son fáciles de analizar, de alta reproducibilidad y automatizables (Spooner *et al*., 2005).

La localización en el genoma de regiones que determinan caracteres importantes en plantas de interés económico y que comúnmente son de herencia cuantitativa, pueden ser estudiados independientemente con la ayuda de marcadores moleculares a través de la manipulación de caracteres simples ligados a estos. Este tipo de estudio al cual podemos denominar "marcaje de caracteres", se basa en la idea propuesta originalmente por Sax en 1923 acerca de los factores genéticos que dominan a caracteres complejos, los que posteriormente se denominaron QTL por sus siglas en inglés (*Quantitative trait loci*) o loci de caracteres cuantitativos. Desde los años 80 se han desarrollado un número de metodologías para cartografiar caracteres de interés determinados por uno o varios genes y de marcadores moleculares "ligados" o que cosegregan con estos, principalmente para hacer más precisa y eficiente la selección de mejores genotipos en programas de mejoramiento genético (Liu, 1998).

Un estudio riguroso para realizar el “marcaje” con marcadores microsatélite de los factores genéticos que determinan la herencia de la resistencia a una enfermedad como la Mancha de agua en el cacao, podría lograrse a través de un análisis de QTLs si se pudiera disponer de una población experimental apropiada, que en el caso específico del cacao, tomaría al menos 12 años desarrollarla. El mapeo de genes y de marcadores moleculares mediante los estudios de asociación es una estrategia que puede realizarse en poblaciones naturales, por esta razón ha recibido especial atención en el estudio de caracteres de importancia económica en especies perennes (Schnell *et al*., 2005; Marcano *et al*., 2008; Laidò *et al*., 2014; Stack *et al*., 2015). No obstante, hay que resaltar que en este tipo de estudios no se deben utilizar poblaciones que presenten subpoblaciones o estructura (Jannink y Walsh, 2002), lo cual puede dar lugar a asociaciones imprecisas.

La finalidad del presente trabajo fue evaluar la respuesta de resistencia a la enfermedad “Mancha de Agua” en árboles de cacao seleccionados de las Colecciones Locales del INIA y de CORPOZULIA, caracterizados mediante marcadores tipo microsatélite, información que creemos puede aportar algún indicio sobre la herencia de la resistencia a la enfermedad y que es además básica para determinar si la constitución genética de los individuos evaluados es apropiada para considerarlos como una población adecuada para ser utilizada en un análisis de asociación entre los marcadores microsatélite y la resistencia a esta enfermedad.

MATERIALES Y MÉTODOS

AISLAMIENTO DEL PATÓGENO Y CONFIRMACIÓN DE SU IDENTIDAD

El patógeno *Phytophthora megasperma* fue recolectado en el “Jardín Clonal” de cacao de la Estación Local Chama, ubicada en el km 41 vía El Vigía-Santa Bárbara, en el municipio Colón del estado Zulia, Venezuela, que se encuentra a 54 m.s.n.m. y cuyo clima se clasifica como Bosque Húmedo Tropical, con un rango de precipitación entre 1.800 a 2.500 mm anuales, temperaturas entre 27 °C y 32 °C y evaporación de 1.661 mm por año, manteniéndose una humedad relativa de 80 %.

Se seleccionaron frutos de cacao que presentaban los síntomas típicos de la enfermedad “Mancha de Agua”. Ello se realizó durante la época de lluvias, cuando se presentan las condiciones de alta humedad favorables para el establecimiento y la reproducción del patógeno. Las mazorcas enfermas se separaron del árbol y se cubrieron con bolsas de papel para su traslado al laboratorio.

Las mazorcas recolectadas fueron lavadas con agua destilada estéril, desinfectadas superficialmente con alcohol etílico 90 % y luego llevadas a una campana de flujo laminar, donde se extrajeron trozos de 1 x 2 mm del tejido afectado de la mazorca, ubicado entre la superficie y el mesocarpo. Bajo condiciones asépticas, se colocaron los trozos de fruto en cápsulas de Petri con medio Agar Zanahoria (AZ) (Rapilly, 1968) y la incubación se llevó a cabo a una temperatura constante de 25 °C y luz fluorescente continua, durante tres días.

Para obtener un aislado puro a partir de estos cultivos en crecimiento, se cortaron secciones del medio AZ, de aproximadamente 1 a 2 mm que incluían micelio de borde, es decir, la zona más externa del micelio con respecto a la muestra. Los trozos cortados, fueron colocados en nuevas cápsulas de Petri con medio AZ y fueron igualmente incubados en luz fluorescente continua a una temperatura promedio de 25 °C, durante otros 5 días.

La caracterización del aislado se realizó contrastando las características morfológicas tanto del micelio, como de sus estructuras internas, con un sistema de clave taxonómica de identificación para especies de *Phytophthora* (Ho, 1981).

SELECCIÓN DE PLANTAS Y FRUTOS

En total fueron seleccionados 68 árboles **[CUADRO 1]** en dos localidades, 51 de éstos fueron escogidos en el Jardín Clonal de la "Colección 2000" ubicado en la Estación Local del INIA en San Juan de Lagunillas, parcelamiento El Estanquillo, municipio Sucre, estado Mérida, Venezuela, ubicada a 1.050 m.s.n.m. y con temperatura media diaria de 23 °C, humedad relativa de 74,4 % y precipitaciones anuales de 540 mm. Los otros 17 árboles evaluados procedían del Banco de Germoplasma de CORPOZULIA ubicado en el km 41, vía El Vigía - Santa Bárbara, municipio Colón del estado Zulia, con las condiciones climáticas ya indicadas para el sitio de aislamiento del patógeno. Uno de estos árboles (SP10X) fue considerado como control susceptible.

Las mazorcas colectadas tenían de 3-4 meses de edad, se mostraban completamente sanas y sin ningún daño aparente. Cada mazorca fue desprendida de la planta y envuelta en una lámina delgada de goma espuma, con el fin de evitar daño mecánico al momento de manipularlas y transportarlas al laboratorio.

EVALUACIÓN DEL FENOTIPO (RESISTENCIA/ SUSCEPTIBILIDAD DE FRUTOS DE CACAO A *P. megasperma*)

La evaluación del fenotipo, en este caso la resistencia/susceptibilidad de plantas seleccionadas de cacao a *P. megasperma*, se realizó inoculando las mazorcas con una suspensión de zoosporas del patógeno a la concentración de 1 x 10^5 zoosporas/ml. Dicha suspensión de zoosporas se obtuvo induciendo la liberación de las mismas del zoosporangio, a partir de aislados puros de *P. megasperma* de 10 días de edad, desarrollados en medio AZ, cultivados a 4 °C por 10 minutos y luego a temperatura ambiente y oscuridad total por otros 30 minutos (Iwaro *et al.*, 1998). Las zoosporas liberadas fueron observadas para su caracterización y cuantificación, utilizando para ello una cámara de Newbauer y un microscopio de luz marca Leica modelo DME.

Los frutos fueron lavados con abundante agua destilada y posteriormente fueron colocados debidamente rotulados en una cámara húmeda. Las cámaras húmedas se prepararon en cajas de plástico de 80 x 40 x 20 cm, dentro de las cuales se colocó una lámina de goma espuma de 2-3 cm de espesor y sobre ésta, una capa de papel absorbente. Estas cámaras húmedas fueron humedecidas con abundante agua destilada estéril.

De cada planta fueron inoculadas 3 mazorcas y una cuarta sin inocular sirvió como tratamiento control, siendo ésta rociada

CUADRO 1. Procedencia de las plantas de cacao seleccionadas.

ID	LOCALIDAD	ID	LOCALIDAD	ID	LOCALIDAD
SJU01	INIA-San Juan	BEN21	INIA-San Juan	04	INIA-San Juan
SJU02	INIA-San Juan	BEN22	INIA-San Juan	HER2	INIA-San Juan
SJU03	INIA-San Juan	BEN23	INIA-San Juan	H3V	INIA-San Juan
SJU04R	INIA-San Juan	BEN24	INIA-San Juan	H3P	INIA-San Juan
SJU05	INIA-San Juan	BEN26	INIA-San Juan	02	INIA-San Juan
SJU06	INIA-San Juan	BEN28	INIA-San Juan	SP10X	CORPOZULIA
SJU07	INIA-San Juan	BEN29	INIA-San Juan	PROJO	CORPOZULIA
SJU09	INIA-San Juan	BOC01	INIA-San Juan	UV101	CORPOZULIA
SJU11	INIA-San Juan	BOC02	INIA-San Juan	SP08	CORPOZULIA
SJU12	INIA-San Juan	BOC03	INIA-San Juan	UV13	CORPOZULIA
SJU13	INIA-San Juan	BOC04	INIA-San Juan	ABA01X	CORPOZULIA
SJU14	INIA-San Juan	BOC05	INIA-San Juan	CAC01	CORPOZULIA
SJU15	INIA-San Juan	BOC06	INIA-San Juan	LOB13	CORPOZULIA
SJU16	INIA-San Juan	BOC09	INIA-San Juan	ADJ05	CORPOZULIA
BEN01	INIA-San Juan	BOC12	INIA-San Juan	UV103	CORPOZULIA
BEN02	INIA-San Juan	BOC14	INIA-San Juan	RA01	CORPOZULIA
BEN04	INIA-San Juan	BOC15	INIA-San Juan	RA05	CORPOZULIA
BEN05	INIA-San Juan	BOC16	INIA-San Juan	CBL04	CORPOZULIA
BEN11	INIA-San Juan	BOC17	INIA-San Juan	CBL05	CORPOZULIA
BEN12	INIA-San Juan	42	INIA-San Juan	CBL06	CORPOZULIA
BEN15	INIA-San Juan	HER1	INIA-San Juan	LOB38	CORPOZULIA
BEN17	INIA-San Juan	H3BP	INIA-San Juan	ABA01	CORPOZULIA
BEN19	INIA-San Juan	81	INIA-San Juan		

sólo con agua destilada estéril. El método de inoculación utilizado fue el de aspersión de gota fina.

Una vez inoculados los frutos, las cámaras húmedas fueron cubiertas completamente con una lámina plástica delgada (envoplast), a fin de conservar una adecuada humedad y mantenidas en oscuridad durante 5 días a una temperatura constante de 24 °C.

Para determinar el nivel de resistencia/susceptibilidad de cada planta, se evaluó la sintomatología de la enfermedad en la mazorca (presencia del síntoma, color y tamaño de la mancha) mediante una escala de un rango del 1 (Altamente resistente a la penetración) al 8 (altamente susceptible) *[CUADRO 2]*. Según Iwaro *et al.* (2006), se considera que la alta resistencia se debe a la imposibilidad del patógeno, tanto a penetrar, como a establecerse en el tejido del fruto.

Una vez transcurrido el período de incubación, se realizó un registro fotográfico de las mazorcas inoculadas de cada árbol, contrastando con su respectivo control sin inocular.

CUADRO 2. Escala de evaluación para la prueba de resistencia/susceptibilidad en frutos de cacao (Iwaro *et al.*, 2006).

RANGO	NIVEL DE INFECCIÓN	CLASIFICACIÓN DE SUSCEPTIBILIDAD
1	Sin síntomas	Altamente Resistente a la penetración
2	1-5 lesiones localizadas	Resistente
3	6-15 lesiones localizadas	Moderadamente Resistente
4	>15 lesiones localizadas	Parcialmente Resistente /Resistente a la Dispersión de la lesión
5	1 – 5 lesiones expandidas	Parcialmente Resistente/Resistente a la penetración
6	6- 15 lesiones expandidas	Moderadamente Susceptible
7	>15 lesiones expandidas	Susceptible
8	Lesiones expandidas	Altamente Susceptible

EVALUACIÓN DEL GENOTIPO

Según el mapa de ligamiento genético de referencia para el cacao (Pugh *et al*., 2004), se escogieron 23 marcadores microsatélites independientes y distribuidos en los 10 grupos de ligamiento del genoma *[CUADRO 3]*.

A partir de hojas de las plantas de cacao seleccionadas se realizó la extracción del ADN total, de acuerdo al protocolo propuesto por Risterucci *et al*. (2003). Las metodologías utilizadas para la amplificación de fragmentos de ADN (PCR: Reacción en Cadena de la ADN Polimerasa), electroforesis horizontal en geles de agarosa y electroforesis vertical en geles de poliacrilamida fueron las reportados por Risterucci *et al*. (2000). El revelado de los geles de poliacrilamida se realizó con nitrato de plata (Bassam *et al*., 1991).

La interpretación de resultados se hizo mediante una codificación de alelos para cada microsatélite, considerando como genotipos de referencia, clones de cacao altamente homocigotos encontrados en estudios previos (BEN02 y RA01), representantes de los ancestros más probables del cacao venezolano (Marcano, 2007). Con estos datos se elaboró una matriz del genotipo de cada uno de los individuos evaluados para cada locus microsatélite.

ANÁLISIS DEL FENOTIPO (RESISTENCIA/ SUSCEPTIBILIDAD A Phytophthora megasperma DRESCHLER)

Luego del período de incubación de las mazorcas inoculadas con el patógeno, los resultados obtenidos fueron graficados para determinar la distribución de frecuencias o número de individuos que mostraron los distintos niveles de reacción ante el patógeno, según la escala de evaluación de síntomas empleada (Iwaro *et al*., 2006).

A partir de los resultados de la evaluación de la resistencia a la enfermedad "Mancha

CUADRO 3. Marcadores microsatélite (SSR) seleccionados según el mapa de ligamiento genético de referencia para el cacao (Pugh *et al.*, 2004).

GL	SSR	cM	pb	Nº EMBL	GL	SSR	cM	pb	Nº EMBL
1	mTcCIR121	32,5	138	AJ566462	6	mTcCIR255	39,1	203	AJ566576
1	mTcCIR272	36,9	258	AJ566591	6	mTcCIR291	62,8	218	AJ566609
1	mTcCIR84	54,5	136	AJ566429	7	mTcCIR190	3,8	166	AJ566518
1	mTcCIR286	68,3	119	AJ566604	7	mTcCIR7	25,9	160	Y16981
2	mTcCIR100	14,8	244	AJ566444	7	mTcCIR55	35,5	234	TCA271954
2	mTcCIR268	38,8	316	AJ566588	8	mTcCIR189	46,9	150	AJ566517
3	mTcCIR120	6,3	95	AJ566461	9	mTcCIR8	52,5	301	Y16982
3	mTcCIR82	30,6	174	AJ566428	9	mTcCIR79	94,1	108	AJ566425
3	mTcCIR167	59,2	254	AJ566496	10	mTcCIR229	11,9	307	AJ566550
4	mTcCIR222	6,5	220	AJ566543	10	mTcCIR91	51,4	186	AJ566435
4	mTcCIR17	23,4	271	TCA16990	10	mTcCIR223	72,4	206	AJ566544
5	mTcCIR109	72	162	AJ566452					

GL: grupo de ligamiento. **SSR**: identificación del marcador. **cM**: ubicación en el mapa de ligamiento genético de referencia para el cacao UF676 x UPA402. **pb**: tamaño del marcador. **N° EMBL**: acceso en la base de datos de biología molecular europea (EMBL).

de Agua" se realizó una Prueba de Kruskal y Wallis para datos No Paramétricos (1952), utilizando para ello el programa XlSTAT 7.5.2 y posteriormente se efectuó la Prueba de Comparación de Medias basada en Rangos (Conover, 1980).

ANÁLISIS DEL GENOTIPO

La matriz de codificación de alelos permitió determinar la frecuencia de los distintos alelos encontrados en los árboles analizados para cada locus microsatélite y establecer valores de heterocigosis (número de loci heterocigotas en el total de loci evaluados) de cada individuo y del promedio de la población utilizando la herramienta Excel (Microsoft Office Excel vers. 2007).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

AISLAMIENTO DE Phytophthora megasperma Y PRUEBAS DE RESISTENCIA AL PATÓGENO EN MAZORCAS

Se logró el aislamiento del patógeno, cuya identificación fue confirmada con la clave taxonómica de identificación para especies de *Phytophthora* (Ho, 1981).

Las pruebas de inoculación de las mazorcas en estado de madurez fisiológica con *P. megasperma*, bajo las condiciones experimentales descritas, resultaron en la manifestación de lesiones típicas de la enfermedad, en diversos grados de severidad y consistentes en las tres repeticiones (mazorcas) de cada tratamiento. Las

observaciones de las mazorcas inoculadas tomadas según la escala de evaluación de Iwaro *et al*. (2006) revelaron resultados variables, encontrándose árboles que presentaron fenotipos desde altamente resistentes (grupo I) hasta altamente susceptibles (grupo XVIII), luego de aplicar la Prueba de Kruskal y Wallis para datos no paramétricos y la prueba de Comparación de Medias basada en rangos *[CUADRO 4]*.

La variabilidad en la respuesta de los cultivares a la inoculación por *P. megasperma*, sugiere que la regulación de la defensa está sujeta a factores poligénicos. Este resultado es coincidente con diversos estudios de resistencia a otras especies de *Phytophthora* en cacao reportados previamente (Clement *et al*., 2003; Lanaud *et al*., 2003).

Ejemplos del registro fotográfico de las mazorcas inoculadas de cada árbol,

CUADRO 4. Pruebas de Comparación de Medias basada en rangos (Conover, 1980), para la evaluación de la respuesta resistencia/susceptibilidad de mazorcas de cacao de los cultivares evaluados frente a *P. megasperma*.

GRUPO	RANGO	CULTIVAR
I	A	SJU16,**HER2**, BOC14, **BOC15**, CAC01, SJU04R, 42
II	AB	BEN19
III	ABC	ABA01X
IV	ABCD	UVI03, SJU13, SJU14
V	ABCDE	02
VI	ABCDEF	CBL05
VII	ABCDEFG	**BOC02**, **HERBP**, ADJ05, **HER3V**, **BEN02**, SJU12, **BOC05**, HER01
VIII	ABCDEFGH	**BOC16**, **BEN24**, **SJU03**, **HERP**, CBL06, **BOC01**, LOB13
IX	ABCDEFGHI	CBL04, BEN05, ABA01
X	BCDEFGHIJ	*RA01*, **BEN26**, *RA05*, UVI01, **SJU02**, BEN17, BOC17, 81, **BOC06**
XI	CDEFGHIJ	**BEN29**
XII	DEFGHIJ	BEN11, UVI13, SJU09, BEN15, **BOC12**, 04, LOB38, SJU07
XIII	EFGHIJ	BEN23
XIV	FGHIJ	**SJU01**, SJU11, BEN21, BEN22
XV	GHIJ	BEN12, **BOC03**
XVI	HIJ	**SJU06**, SP08, **BEN01**, BEN04, SJU15
XVII	IJ	**BOC09**, **POR. ROJO**, SJU05, BOC04
XVIII	J	**BEN28**, **SP10X**

Los resultados obtenidos en la presente investigación fueron agrupados con base en la escala de clasificación de síntomas propuesta por Iwaro *et al.* (2006). En negritas: genotipos homocigotas Criollos (Criollos antiguos). En *itálicas*: genotipos homocigotas Forasteros. Altamente Resistente (valores de 1, 2 y 3 en la escala), Moderadamente Resistentes (valores de 4, 5 y 6), Susceptibles (valores de 7 y 8).

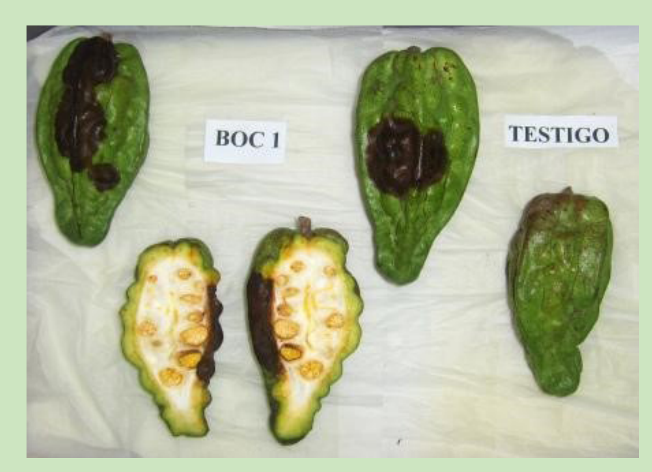
contrastando con su tratamiento control sin inocular (Testigo) se muestran en las **FIGURAS 1, 2 Y 3**; puede notarse que las tres mazorcas inoculadas de cada árbol, mostraron niveles similares de síntomas y que ninguna mazorca empleada como control sin inocular mostró lesión alguna, lo que, aunado a las reacciones esperadas en las mazorcas de la planta control susceptible (SP10X), apoya la confiabilidad de las pruebas realizadas.

En la **FIGURA 4** se muestra la distribución de frecuencias de individuos con los diferentes niveles de reacción ante el patógeno o fenotipo en la población total evaluada, según la escala utilizada **[CUADRO 2]**, evidenciándose que, en general, hay una acumulación de plantas (67,65 %) en los niveles 4, 5, 6 y 7 (desde parcialmente resistente/resistente a la dispersión de la lesión, hasta susceptible) y existe un 7,35 % de individuos que muestran resistencia y moderada resistencia, mientras que 10,29 % son altamente resistentes y sólo 2,9 % altamente susceptibles.

Iwaro *et al*. en 2006, reportaron un estudio similar en el que, además de establecer la escala de calificación de las lesiones que produce en los frutos la especie *Phytophthora palmivora* (lesiones localizadas o expandidas), relacionándolas con niveles de dispersión de la lesión y de penetración del patógeno, evaluaron la resistencia en 816 accesiones de los bancos de germoplasma del CATIE (Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza, Costa Rica) y del ICG (International Cocoa Genebank, Trinidad); estas colecciones incluyen árboles de cacao



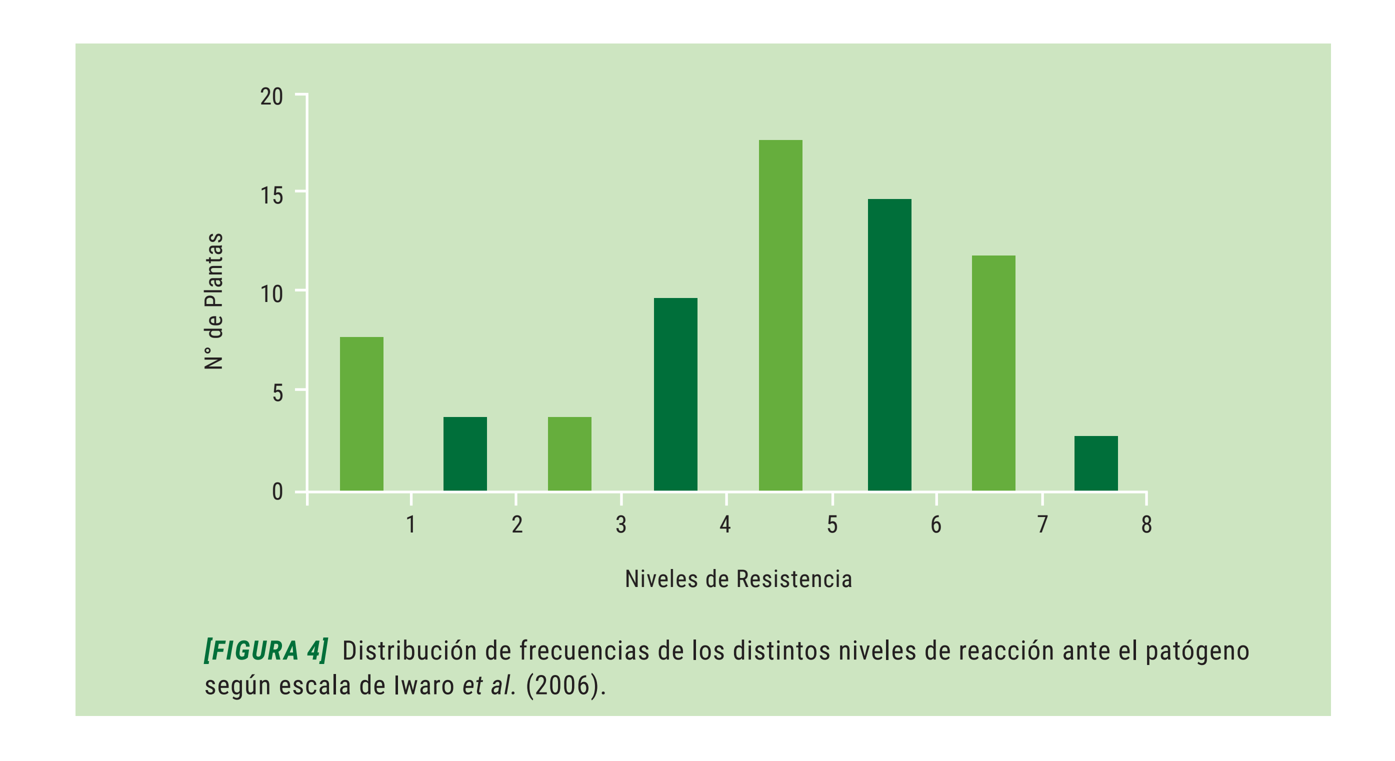
[FIGURA 1] Muestras de mazorcas de cacao provenientes de planta evaluada con alta resistencia.



[FIGURA 2] Muestras de mazorcas de cacao provenientes de planta con resistencia intermedia.



[FIGURA 3] Muestras de mazorcas de cacao provenientes de planta altamente susceptible.



[FIGURA 4] Distribución de frecuencias de los distintos niveles de reacción ante el patógeno según escala de Iwaro *et al.* (2006).

cultivado y silvestre, donde la distribución de frecuencias de los niveles de resistencia encontrada mostró que un 68,9 % de las plantas evaluadas presentaban algún nivel de sensibilidad al patógeno, encontrándose que 105 árboles (12,9 %), podían emplearse como fuentes de resistencia.

ANÁLISIS DEL GENOTIPO

Sólo dos alelos por locus microsatélite fueron encontrados en casi la totalidad de los individuos evaluados, siendo el número de alelos promedio 2,39, lo que indica la presencia de un tercer alelo, probablemente de origen Criollo (Mora, 2009). El alelo más frecuente coincidió con el alelo Criollo reconocible en el genotipo referencial homocigoto Criollo (BEN02) y el segundo alelo más frecuente con el del genotipo referencial homocigota Forastero de la Cuenca baja del Amazonas (RA01) (Marcano, 2007). Esta estrecha base genética es consistente con la que reportaron Motamayor *et al*. (2003) para los denominados cacaos Criollos modernos, frecuentes en las zonas productoras de cacao principalmente en el occidente de Venezuela, los cuales son producto de un cruce que originalmente ocurrió entre sólo dos ancestros.

Los resultados del "genotipaje" permitieron identificar, dentro de los individuos evaluados a los cultivares Criollos altamente homocigotas o antiguos, con valores de Heterocigosis cercanos a 0 (destacados en negritas en el *CUADRO 4*), y a los que portan introgresiones en diversos niveles del ancestro Forastero (heterocigotas), entre los cuales se observó un rango amplio, tal como lo confirman los valores de Heterocigosis, mostrados en el

CUADRO 5, que varían entre 0,10 (genotipos cercanos a Criollos) y 0,91 (cercanos al híbrido F1). Dos individuos fueron genotípicamente homocigotas Forasteros (en itálicas en el **CUADRO 4**), ya que su alelo coincidía con el alelo del genotipo referencial Forastero. No se encontraron individuos heterocigotas en los que prevaleciera el alelo Forastero.

El "genotipaje" nos indica que entre los 68 individuos evaluados, 25 son Criollos altamente homocigota, 41 heterocigotas y 2 Forasteros altamente homocigotas, lo que sugeriría estructura en la población o subpoblaciones, siendo necesario realizar un estudio de la estructura poblacional (Pritchard *et al*., 2000) y a partir de éste, la conformación de una población más adecuada para un análisis de asociación (Janninck *et al*., 2002) entre marcadores microsatélite y la resistencia a la enfermedad Mancha de agua.

Detallando la información presentada en los **[CUADROS 4 Y 5]**, podemos destacar que:

- Los individuos Criollos homocigotas o antiguos, muestran variabilidad en cuanto a su reacción de resistencia al patógeno *Phytophthora megasperma*; éstos pueden estar incluidos, según la Prueba de Medias basada en Rangos, dentro de los grupos con mayor resistencia al patógeno (I al III), como dentro de los más susceptibles (grupos XV al XVIII); la mayoría se encontraron en el rango de resistencia moderada (grupos IV al XIV).
- Los Forastero homocigotas (RA01 y RA05), se ubicaron en el grupo X, donde

CUADRO 5. Heterocigosis (H) de los árboles evaluados.

PLANTA	H	PLANTA	H	PLANTA	H	PLANTA	H	PLANTA	H
SJU01	0,04	BEN01	0,09	BEN28	0,00	42	0,35	ABA01X	0,70
SJU02	0,04	BEN02	0,00	BEN29	0,00	HER1	0,44	CAC01	0,26
SJU03	0,00	BEN04	0,13	BOC01	0,09	H3BP	0,04	LOB13	0,34
SJU04R	0,83	BEN05	0,13	BOC02	0,04	81	0,65	ADJ05	0,61
SJU05	0,39	BEN11	0,17	BOC03	0,09	04	0,26	UV103	0,87
SJU06	0,04	BEN12	0,52	BOC04	0,17	HER2	0,00	RA01	0,09
SJU07	0,56	BEN15	0,17	BOC05	0,09	H3V	0,00	RA05	0,04
SJU09	0,26	BEN17	0,26	BOC06	0,09	H3P	0,00	CBL04	0,26
SJU11	0,74	BEN19	0,61	BOC09	0,00	02	0,70	CBL05	0,34
SJU12	0,56	BEN21	0,30	BOC12	0,09	SP10X	0,09	CBL06	0,26
SJU13	0,61	BEN22	0,56	BOC14	0,45	PROJO	0,00	LOB38	0,48
SJU14	0,74	BEN23	0,17	BOC15	0,04	UV101	0,91	ABA01	0,39
SJU15	0,26	BEN24	0,04	BOC16	0,09	SP08	0,13	Media	0,28
SJU16	0,52	BEN26	0,04	BOC17	0,22	UV13	0,22		

se incluyen individuos con el fenotipo de moderada resistencia.

- Los individuos con Heterocigosis entre 0,10 y 0,91 (heterocigotas), también mostraron un rango amplio de respuestas, incluyendo susceptibilidad; en las 5 plantas más susceptibles, la Heterocigosis mostró valores entre 0,13 y 0,26. La alta resistencia en este grupo de individuos se observó en 10 árboles que presentaron una Heterocigosis entre 0,26 y 0,83.

La integración de la información sobre genotipo y fenotipo de los individuos evaluados, nos permite sugerir que la susceptibilidad a la enfermedad estudiada no podría vincularse estrictamente a los genotipos Criollos homocigota, ya que se observaron dentro de este grupo, tanto fenotipos de alta susceptibilidad (BEN28 y SP10X), como de alta resistencia (HER02 y BOC15), presentando la mayoría de los Criollos evaluados (16 árboles), moderada resistencia.

De los 25 árboles con el genotipo Criollo altamente homocigota considerados en esta investigación, 18 mostraron algún nivel de resistencia, lo que contrasta con la referida alta susceptibilidad de los tipos Criollos a las plagas y las enfermedades, que es tan generalizada en la literatura (Reyes & Reyes 2000); incluso dos árboles, HER02, un Criollo antiguo “Pentágona” y BOC15, un Criollo antiguo del tipo “Andino”, mostraron altos niveles de resistencia. Por otro lado, los 6 genotipos Criollos antiguos con fenotipos altamente susceptibles correspondieron a dos Criollos tipo “Porcelana”, 4 “Andinos” y un “Guasare”.

Los cacaos Criollos Andinos en los cuales se incluyen árboles con alta homocigosis que se han encontrado en los estados Mérida y Táchira, presentan variabilidad en sus caracteres morfológicos; asimismo, los “Porcelana” y los Guasare del estado Zulia y los del tipo “Pentágona”, todos muestran particularidades en sus rasgos; además de su adaptabilidad a diferentes ambientes y altitudes (Ramos *et al*., 2003; Ramos *et al*., 2004; Chacón *et al*., 2007).

Un estudio molecular efectuado por Soto (2010) con 75 marcadores microsatélite reveló leves diferencias entre representantes de los diversos tipos de Cacaos antiguos hallados en el occidente de Venezuela, a pesar de su alta homocigosis en la mayoría de los marcadores moleculares empleados. Este resultado apoyaría alguna diversidad entre los diferentes tipos de cacaos Criollos antiguos venezolanos. La variabilidad genética entre individuos Criollos antiguos de diferentes tipos podría explicar las diferencias en sus respuestas de resistencia a la Mancha de agua.

La alta susceptibilidad de los cacaoteros criollos a enfermedades reportada en la literatura internacional (Lanaud *et al*., 2003), puede estar influenciada en parte por la escasez de cultivares Criollos disponibles en otros países cacaoteros para la realización de pruebas de resistencia a enfermedades, por lo que no se ha reportado estudio alguno sobre resistencia a enfermedades en los cacaos Criollos antiguos que abarque la diversidad de este tipo de individuos en la cantidad considerada en el presente trabajo.

En relación al grupo de árboles heterocigotas analizados (41), 7 plantas (17,1 %) exhibieron una resistencia alta al patógeno y heterocigosis mayores a 0,27; 28 árboles (68,3 %) mostraron una resistencia media y heterocigosis desde 0,26 hasta 0,87, mientras que la respuesta de susceptibilidad se observó en un 14,6 % de los cultivares (6 árboles), de los cuales los 5 más susceptibles tuvieron valores de H menores a 0,17 (cercanos a Criollos). Ello pudiera sugerir que, en lo que respecta a la resistencia a la enfermedad “Mancha de agua” en las plantas evaluadas, las introgresiones con genes del ancestro Forastero más probable de los cacaos venezolanos, se relacionarían con la resistencia; sin embargo, los genotipos Forastero homocigota RA01 y RA05, mostraron niveles de resistencia moderada, lo que podría explicarse con la expresión de algún nivel de heterosis o, de acuerdo a lo sugerido por los resultados, un ancestro Criollo con algún nivel de resistencia a la enfermedad. Se debe mencionar que los marcadores microsatélites independientes dispersos en el genoma del cacao, utilizados en esta caracterización molecular, no están necesariamente asociados con la resistencia a la enfermedad; sólo los marcadores asociados pueden ser informativos para determinar cuál genotipo tendría una vinculación estadísticamente significativa con la resistencia objetivo del análisis de asociación.

CONCLUSIONES

Los procedimientos empleados en este trabajo para la preparación del inóculo, la inoculación y la incubación de mazorca-patógeno en cámara húmeda, resultaron ser convenientes en la manifestación de lesiones típicas de la enfermedad en diversos grados de severidad, al ser comparados con testigos susceptibles a nivel de campo y testigos negativos, por lo que podemos afirmar que es posible efectuar la evaluación de árboles de cacao en su reacción ante la enfermedad “Mancha de agua” causada por el patógeno *Phytophthora megasperma* Dreschler, a nivel de laboratorio mediante el uso de mazorcas desprendidas.

La variabilidad en la respuesta de los cultivares a la inoculación por *P. megasperma*, sugiere que la regulación de la resistencia está sujeta a factores poligénicos, como se ha reportado para otras especies de *Phytophthora*.

Los resultados del “genotipaje” realizado mediante 23 marcadores microsatélite independientes distribuidos en los 10 grupos de ligamiento del genoma del cacao, combinado con la prueba de medias, nos permiten sugerir que algunos genotipos Criollos homocigotas o antiguos pudieran presentar algún nivel de resistencia a la enfermedad “Mancha de agua”, lo que indicaría que existe diversidad entre los genotipos Criollos, que no sólo se manifiesta en sus caracteres morfológicos, sino en su comportamiento ante esta enfermedad.

Los cultivares evaluados con genotipo heterocigota (con heterocigosis entre 0,1 y 0,91) presentaron resistencia de moderada a baja en su mayoría y alta sólo en 23,3 % de estos individuos; por otro lado, los genotipos forastero homocigotas presentaron reacción de moderada resistencia.

Los resultados obtenidos en la evaluación de la resistencia de los árboles de cacao provenientes de colecciones de cacao del INIA y CORPOZULIA, constituyen un aporte importante al conocimiento de las accesiones

en cuanto al comportamiento de estas ante la enfermedad Mancha de agua que particularmente afecta a árboles de cacao Criollo, genotipos especialmente frecuentes en estas colecciones y en la región sur del lago de Maracaibo. De este estudio se deriva que las plantas identificadas como HER02 y BOC15 (Criollos antiguos) y CAC01 (H=0,26), 42 (H=0,35), BOC14 (H=0,45), SJU16 (H=0,52), ABA01X (H=0,70) y SJU04R (H=0,83), constituyen ejemplares de interés en cuanto a la resistencia a esta enfermedad, como para ser considerados en estrategias de propagación y mejoramiento del cultivo en el occidente del país.

El análisis mediante marcadores microsatélites, detectó entre los 68 individuos, 25 Criollos homocigota, 41 heterocigotas y 2 Forasteros homocigota, por lo que será necesario efectuar un análisis de estructura poblacional a partir del que se pueda conformar una población más favorable para un análisis de asociación entre marcadores moleculares y la resistencia a la Mancha de agua.

AGRADECIMIENTOS

Esta investigación fue financiada por el CDCHTA de la Universidad de Los Andes, mediante el Proyecto C-1571-08-01-B y por el Fondo Nacional de Ciencia y Tecnología, mediante el sub proyecto 03 del Proyecto de Investigación en Red en el Marco de la Ruta del Chocolate, Convenio INIA-FONACIT Nº 200500898. Los autores le agradecen a la Dra. Francisca Ely por su colaboración en la traducción del resumen al inglés.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BASSAM, B., CAETANO-ANOLLÉS G. & P. GRESSHOFF. 1991. A fast and sensitive silver-staining for DNA in polyacrylamide gels. Analytical Biochemistry 196: 80-83

BLAHA, G., ESKES, A., KÉBE, B.I. & G.M. TAHI. 2000. Early screening of resistance to *Phytophthora* spp. by means of leaf disc inoculation. *In*: Working procedures for cocoa germoplasm evaluation and selection. Proceedings of the CFC/ICCO/IPGRI Project workshop (A. Eskes, J.M.M. Engels and R.A. Lass, eds). Montpellier, France. Rome: IPGRI, pp. 103-108.

CAPRILES, L. 1978. Enfermedades del cacao en Venezuela. Fondo Nacional del Cacao. Venezuela. Sin número de páginas.

CHACÓN, I., GOMÉZ, C. & V. MÁRQUEZ. 2007. Caracterización morfológica de frutos y almendras de plantas de cacao (*Theobroma cacao* L.) en la región suroccidental de Venezuela. Revista de la Facultad de Agronomía (LUZ), 24(1): 202-207.

RISTERUCCI, A.M., CLÉMENT, D., MOTAMAYOR, J.C., J .N'GORAN & C. LANAUD. 2003a. Mapping QTL for yield components, vigor and resistance to *Phytophthora palmivora* in *Theobroma cacao* L. Genome 46: 204-212.

CONOVER, W.J. 1980. Practical Nonparametric Statistic. John Wiley & Sons, 2º Edition, 231 p.

DELGADO, A. 1985. Control químico de la mancha de agua causada por *Phytophthora megasperma* Dreschler en Cacao. Revista de la Facultad de Agronomía (LUZ) 7: 199-215.

FLAMENT, M., KEBE, I., D. CLEMENT, I. PIERETTI, A.M. RISTERUCCI, J.A.K. N'GORAN, C. CILAS, D. DESPRÉAUX & C. LANAUD. 2001. Genetic mapping of resistance factors to *Phytophthora palmivora* in cocoa. Genome 44: 79-85.

HO, H.H. (1981). Synoptic keys to the species of *Phytophthora*. Mycologia 73(4): 705-714.

ICCO Annual Report for 2011-2012. http://www.icco.org/about/anualreport.aspx.

IWARO, A.D., SREENIVASAN, T.N. & P. UMAHARAN. 1997. *Phytophthora* resistance in cacao (*Theobroma cacao*): Influence of pod morphological characteristics. *Plant Pathology* 46: 557-565.

IWARO, A.D., THÉVENIN, J.M., D.R. BUTLER & A. ESKES. 2005. Usefulness of the detached pod test for assessment of cacao resistance to *Phytophthora* pod rot. *European Journal of Plant Pathology* 113: 173-182.

IWARO, A.D., THÉVENIN, J.M.; BUTLER, D.R. & A. ESKES. 2006. Validation studies on the detached pod test and leaf disc inoculation method for the assessment of cocoa resistance to *Phytophthora* infection. In: G*lobal approaches to cocoa germplasm utilization and conservation: Final report of the CDC/CCO/IPGRI project on "Cocoa germplasm utilization and conservation: A global approach" (1998-2004).* A. Eskes and Y. Efron eds. Amsterdam: pp. 108-115.

JANNINK, J. & B. WALSH. 2002. *Association Mapping in Plant Populations. In Quantitative Genetics, Genomics and Plant Breeding.* (ed. M.S. Kang). CAB International. pp. 59-68.

KRUSKAL, W.H. & W.A. WALLIS. 1952. Use of ranks in one-criterion variance analysis. *J. Amer. Statist. Ass.* 47: 583-621.

LAIDÒ, G., MARONE, D., M.A. RUSSO, S.A. COLECCHIA, A.M. MASTRANGELO, P. DE VITA & R. PAPA. 2014. Linkage Disequilibrium and Genome-Wide Association Mapping in Tetraploid Wheat (*Triticum turgidum* L.). *PLoS One* 9(4): e95211.

LANAUD, C., MOTAMAYOR, J.C. & O. SOUNIGO. 1999. Cacao. In: *Genetic Diversity of Cultivated Tropical Plants*. (J. C. Glaszmann, ed.). CIRAD. Montpellier, France. pp. 125-151

LANAUD C., RISTERUCCI A.M., I. PIERETTI I, J.A.K. N'GORAN & D. FARGEAS. 2003. Characterisation and genetic mapping of resistance and defence gene analogs in cocoa (*Theobroma cacao* L.) *Molecular Breeding* 13: 211-227.

LIU, B. 1998. *Statistical Genomics: Linkage, Mapping and QTL Analysis*. CRC Press, USA. 611 p.

LOPES, U., PAIM, M., L. NEWMAN, S. SILVA, K. PERES & J. PIRES. 2006. Resistencia de las selecciones de cacao de cultivadores a *Phytophthora citrophthora* en Brasil. 15 Conferencia Internacional de Investigación en Cacao. Resúmenes. San José, Costa Rica.

MARCANO, M. 2007. Cartografía genética de factores del rendimiento y caracteres morfológicos en una población cultivada de cacao Criollo "moderno" (*Theobroma cacao* L.), mediante un análisis de asociación. Universidad de Los Andes. Facultad de Medicina, Postgrado en Ciencias Médicas Fundamentales. Mérida, Venezuela. 127 p. (Tesis Doctoral).

MARCANO M., PUGH T., E. CROS, S. MORALES, E.A. PORTILLO, B. COURTOIS, J.C. GLASZMANN, J.M. ENGELS, W. PHILLIPS, C. ASTORGA, A.M. RISTERUCCI, O. FOUET, V. GONZÁLEZ, K. ROSENBERG, I. VALLAT, M. DAGERT & C. LANAUD. 2007. Adding value to cocoa (*Theobroma cacao* L.) germplasm information with domestication history and admixture mapping. *Theor. Appl. Genet*. 114(5): 877-84.

MARCANO, M., MORALES, S., M.T. HOYER, B. COURTOIS, O. FOUET, T. PUGH, E. CROS, M. DAGERT, V. GONZÁLEZ & C. LANAUD. 2008. A genomewide admixture mapping study for yield factors and morphological traits in a cultivated cocoa (*Theobroma cacao* L.) population. *Tree Genetics and Genomes* 5(2): 329-337.

MORA, V. 2009. Utilización de microsatélites en el estudio de la resistencia de árboles seleccionados de cacao (*Theobroma cacao* L.) a la enfermedad "Mancha de agua" (*Phytophthora megasperma*). Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Los Andes. Mérida, Venezuela. 83 p. (Trabajo Especial de grado).

MORENO, M. 2004. *El cultivo del cacaotero en Venezuela*. Universidad Ezequiel Zamora. Editorial UNELLEZ. 279 p.

MOTAMAYOR, J.C., RISTERUCCI, A.M., P.A. LÓPEZ, C.F. ORTIZ, A. MORENO & C. LANAUD. 2002. Cacao domestication I: The origin of the cacao cultivated by the Mayas. *Heredity* 889: 380-386.

MOTAMAYOR, J.C., RISTERUCCI, A.M., M. HEATH & C. LANAUD. 2003. Cacao domestication II: Progenitor germplasm of the Trinitario cacao cultivar. *Heredity* 91: 332-330.

PHILLIPS-MORA, W. & J.J. GALINDO. (1989) Método de inoculación y evaluación de la Resistencia a *Phytophthora palmivora* en frutos de cacao (*Theobroma cacao*). *Turrialba, Costa Rica* 39 (4): 488-496.

PINO, Norelys. (2009) Evaluación de la resistencia en cultivares promisorios de cacao (*Theobroma cacao* L.) a la Moniliasis en la zona sur del lago de Maracaibo. Universidad Nacional Experimental del Táchira (UNET), Postgrado en Agronomía. Táchira, Venezuela. 50 p. (Tesis de Maestría).

PRITCHARD, J.K., STEPHENS, M. & P. DONNELLY. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155: 945-959.

PUGH, T., FOUET, O., A.M. RISTERUCCI, P. BROTTIER, M. ABOULADZE, C. DELETREZ, B. COURTOIS, D. CLÉMENT, P. LARMANDE, J.A.K. N´GORAN, & C. LANAUD. 2004. A new cacao linkage map based on codominant markers: development and integration of 201 new microsatellite marker. *Theor. Appl. Gen.* 108: 1.151-1.161.

RISTERUCCI, A.M., PAULIN, D., M. DUCAMP, J.A.K. N´GORAN & C. LANAUD. 2003. Identification of QTLs related to cocoa resistance to three species of *Phytophthora*. *Theor. Appl. Gen.* 108: 168-174.

RAMOS, G., GÓMEZ, A., & A. DE ASCENCAO. 2004. Caracteres morfológicos determinantes en dos poblaciones de cacao criollo del occidente de Venezuela. *Agronomía Tropical* 54(1): 45-62.

RAMOS, G., GÓMEZ, A., M. MARCANO. & M. VERA. 2003. *Catálogo de Descriptores de Cacao Colección Occidente 2000*. (Versión digital). Depósito legal lf2232005630473.

RAPILLY, F. 1968. Les tecniques de mycologie en pathologie végétale. *Ann. Epiphyt.* 19: 1-101.

REYES, H. & REYES, L. 2000. *El Cacao en Venezuela. Moderna tecnología para su cultivo*. Chocolates El Rey. Caracas, Venezuela.

RUMBOS, R., MOYA, A., H. QUEVEDO, K. ROMERO, D. PARRA, B. GUTIÉRREZ, D. SOSA, S. MONSALVE & S. PERES. 2007. Primer Reporte de la Mancha de Agua en Frutos de Cacao (*Theobroma cacao* L.) causada por *Phytophthora megasperma* Dreschler en el sector Bohordal Río Caribe, Edo. Sucre. III Congreso Nacional del Cacao y su Industria. Maracay, Edo. Aragua.

SAX, K. 1923. The association of size differences with seed coat pattern and pigmentation in *Phaseolus vulgaris*. *Genetics* 8: 552-560.

SOTO, H. 2010. Caracterización molecular de cacaoteros criollos antiguos venezolanos (*Theobroma cacao* L.) mediante microsatélites. Departamento de Biología, facultad de Ciencias, Universidad de Los Andes. Mérida, Venezuela 76p. (trabajo Especial de Grado).

SCHNELL R.J., OLANO, C.T., J.S. BROWN, A.W. MEEROW & C. CERVANTES-MARTÍNEZ. 2005. Retrospective determination of the parental population of superior cacao (*Theobroma cacao* L) seedlings and association of microsatellite alleles with productivity. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 130(2): 181-190.

SPOONER, D.R., VAN TREUREN, R. & M. DE VICENTE. 2005. Molecular Markers for genebank management. IPGRI. *Technical Bulletin* 10.

STACK, J.C., ROYAERT, S., O. GUTIERREZ, C. NAGAI, I.S. ARAÚJO, R. SCHNELL & MOTAMAYOR, J.C. 2015. Assessing microsatellite linkage disequilibrium in wild cultivated and mapping populations of *Theobroma cacao* L. and its impact on association mapping. Tree Genetics and Genomes 11:19 DOI 10.1007/s11295-015-0839-0.

ADDINSSOFT, 2015. XLSTAT 2015: *Data Analysis and Statistical Solution for Microsoft Excel*. Paris, France.